

*Aus dem Hygiene-Institut
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)*

**Die Entfernung verschiedener Arten von
Mikroorganismen aus einer wässrigen
Suspension durch eine Behandlung
mit Ionenaustauschern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Christa Dehnert
aus Braunscheig
1960

Dekan: Prof. Dr. Dr. *M. Herrmann*

Referent: Prof. Dr. Dr. *G. Gillissen*

Korreferent: Prof. Dr. *H. Kliewe*



*Aus dem Hygiene-Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)*

Die Behandlung von Keimsuspensionen mit Ionenaustauschern*

Von Christa Dehnert

Es ist möglich, Colibakterien aus wäßrigen Suspensionen mit Anionenaustauschern zu entfernen. Kationenaustauscher haben dagegen praktisch keinen Effekt (*Gillissen*). Die Austauscherleistung ist abhängig von der Höhe der Austauschersäule, der Durchlaufgeschwindigkeit und der Zellkonzentration der Keimsuspension. Eine wiederholte Verwendung des Austauschers mit mindestens gleichgutem Resultat ist nach zwischenzeitlicher Regenerierung möglich. Durch eine antistatische Behandlung oder durch Kochsalz wird der Anionenaustauscher praktisch wirkungslos.

Nach diesen Ergebnissen lag die Frage nahe, ob dieser Effekt von Ionenaustauschern auch bei Verwendung anderer Arten von Mikroorganismen zu beobachten ist.

In der Literatur liegen über die Adsorption von Bakterienzellen oder Sporen an Ionenaustauscher nur wenige Angaben vor. *Martin* und Mitarb. sahen mit einem Anionenaustauscher nur einen geringen Effekt. Allerdings wurde die Keimsuspension mit Austauschermaterial nur geschüttelt, wodurch bekanntlich optimale Bedingungen für eine Austauscherleistung nicht vorhanden sind. Dasselbe ist der Fall bei den orientierenden Versuchen von *Puck* und *Sagik*. *Rotman* (1960) gab in einer lit. Arbeit an, daß schonend mit Ultraschall behandelte Keime vollständig an Ionenaustauscher angelagert werden, jedoch konnten entsprechende Hinweise aus der zitierten Originalarbeit (*Rotman*, 1956) nicht entnommen werden.

Material und Methoden

Verwendet wurden je 100 ml des Anionenaustauschers MSB** und des Kationenaustauschers STS** (Beschreibung der Austauscher und deren Regenerierung s. *Gillissen*) in Säulen mit einer lichten Weite von 1,3 cm. Die Durchlaufgeschwindigkeit der Keimsuspension wurde auf 100 ml/Std. eingestellt, ein bei den früheren Versuchen mit *E. coli* als günstig ermittelter Wert.

* Die Untersuchungen wurden durch Mittel des Bundesministeriums für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft ermöglicht.

** Die Austauscher wurden liebenswürdigerweise von Herrn Direktor Schulz, Chemische Fabrik, Budenheim/Rhein, zur Verfügung gestellt.

Als Testkeime dienten je ein Stamm Bäckerhefe, *Ps. fluorescens*, *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511, *Staph. albus*, *Bac. subtilis* und *Bac. anthracis*. Die Bakterien stammten aus 18 Std. alten Schrägagarkulturen, die Hefezellen von einer 48 Std. alten Kultur auf festem Czapek-Dox-Medium und die beiden Bazillenstämme von ebenso alten Schrägagarkulturen. In den beiden letzteren Fällen wurden die Zellen aus älteren Kulturen verwandt, da eine weitgehende Versporung wünschenswert war. Alle Testkeime wurden mit Aqua dest. abgeschwemmt, 2mal gewaschen und nach mikroskopischer Keimzählung durch Verdünnen mit Aqua dest. auf 10^3 Zellen/ml eingestellt. Vor Versuchsbeginn wurden zur Ermittlung der sog. Lebendkeimzahl („Koloniezahl“) pro ml als Bezugsgröße von verschiedenen Verdünnungsstufen dieser Suspension 0,3 ml auf je 5 Agarplatten ausgestrichen. Aus Sicherheitsgründen wurde bei *Bac. anthracis* auf die mikroskopische Zellzählung verzichtet und nur die Lebendkeimzahl/ml für die Einstellung der Zellkonzentration herangezogen. Das bedingte, daß in diesem Fall die Zellsuspension vor Versuchsbeginn über Nacht im Eisschrank aufbewahrt wurde.

Verschiedene Volumina der Keimsuspensionen wurden nach Durchlaufen der Austauschersäulen über Membranfilter Co 5 (Membranfiltergesellschaft Göttingen) filtriert und die Filter dann auf den entsprechenden Nährböden bebrütet. Die nach 48stdg. Inkubation bei 37°C gewachsenen Kolonien wurden erfaßt und auf „Koloniezahl“/ml des filtrierten Volumens umgerechnet. Die in den Tabellen angegebenen Dezimalstellen für Angaben der Keimkonzentration stellen keine Genauigkeitswerte dar,

Tabelle 1
Die Behandlung einer Suspension von Bäckerhefe
mit dem Anionenaustauscher MSB

		Nummer der Versuche									
		1		2		3		4		5	
		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.	
Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50	10	0,2	0	0	0	0	1	0,02	1	0,02
2	50	4	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0
3	50	2	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
4	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5—12 je	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

mit dem Kationenaustauscher STS

Vorlauf	33	287	8,7	251	7,6	217	6,6	—	—	—	—
1—7 je		Rasen		Rasen		Rasen		—	—	—	—
Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml		10^3		10^3		10^3		10^3		10^4	
„Koloniezahl/ml“ d. Ausgangssusp. (Bezugsgröße)		586		648		416		322		2940	

sondern bedeuten nur Hinweise dafür, daß die betreffende Fraktion nicht steril war. Dieselben Austauscher wurden nach Regenerierung mehrmals verwandt, jedoch wurden die Säulen für jede Keimart neu gefüllt. Der Vorlauf, d. h. das zwischen den Austauscherkörnern liegende Flüssigkeitsvolumen betrug 33 ml.

Ergebnisse

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Versuche mit Bäckerhefe wiedergegeben.

Aus Tab. 1 ist zu entnehmen, daß die Keime (vornehmlich Sporen) mit dem Anionenaustauscher MSB, nicht aber mit dem Kationenaustauscher STS aus der Suspension entfernt werden. Dies ist um so auffälliger, als eine Durchbruchgrenze bei einer (mikroskopischen) Zellkonzentration von $10^3/\text{ml}$ und sogar bei einer solchen von $10^4/\text{ml}$ und einem Volumen von jeweils 360 ml nicht erreicht wurde. Durch eine wiederholte Verwendung derselben Austauschermasse nach zwischenzeitlicher Regenerierung konnten Ermüdungserscheinungen des Austauschers nicht beobachtet werden.

In Tab. 2 sind die gleichen Versuche mit *Ps. fluorescens* wiedergegeben.

Tabelle 2

Die Behandlung einer Suspension von *Ps. fluorescens*

mit dem Anionenaustauscher MSB

		Nummer der Versuche									
		1		2		3		4		5	
		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.	
Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	0	0	0	0	0	0	1	0,03	1	0,03
1	50	0	0	3	0,06	1	0,02	2	0,04	5	0,1
2	50	1	0,02	0	0	0	0	1	0,02	18	0,36
3	50	0	0	2	0,04	1	0,02	1	0,02	18	0,36
4	50	0	0	1	0,02	0	0	3	0,06	—	—
5	20	1	0,05	1	0,05	1	0,05	0	0	0	0
6	20	0	0	1	0,05	0	0	1	0,05	1	0,05
7	20	0	0	2	0,1	0	0	3	0,15	1	0,05
8	20	2	0,1	1	0,05	2	0,1	0	0	2	0,1

mit dem Kationenaustauscher STS

Vorlauf	33	0	0	39	1,2	9	0,3	396	12	2	0,06
1	20	0	0	409	20,5	164	8,2	Rasen		Rasen	
2	20	593	29	Rasen		Rasen		Rasen		Rasen	
3—7 je	20	Rasen		Rasen		Rasen		Rasen		Rasen	

Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3
„Koloniezahl/ml“ d. Ausgangssusp. (Bezugsgröße)	250	626	628	420	332

Aus Tab. 2 ist zu entnehmen, daß der Anionenaustauscher MSB gegenüber dem Kationenaustauscher STS auch bei diesem Testkeim einen eindeutigen Effekt hat. Allerdings scheint auch der Kationenaustauscher eine, wenn auch verhältnismäßig geringe Wirkung zu besitzen. Diese geht aber bei derselben Versuchsreihe schon nach einem kleinen Durchlaufvolumen und nach wiederholter Anwendung verloren. Beim Versuch mit dem Anionenaustauscher sind sterile Fraktionen selten. Meist wachsen aber nur einzelne Kolonien, die man als eine akzidentelle Verunreinigung ansehen könnte, zumal die mittlere „Koloniezahl“/ml auch bei größeren Fraktionen stets unter 1 liegt. Andererseits kommen diese Verunreinigungen regelmäßig über die ganze Versuchsreihe verteilt vor. Dieses Bild entspricht den Erfahrungen bei den früheren Versuchen mit *E. coli*, wenn

Tabelle 3

Die Behandlung einer Suspension von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511

mit dem Anionenaustauscher MSB

		Nummer der Versuche							
		1		2		3		4	
		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.	
Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	Nr. Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	1	0,2	12	0,24
3	50	0	0	0	0	0	0	32	0,64
4	50	1	0,02	0	0	1	0,02	202	4,04
5	20	1	0,05	0	0	2	0,1	65	3,25
6	20	0	0	0	0	2	0,1	32	1,6
7	20	0	0	0	0	1	0,05	14	0,7
8	20	0	0	0	0	0	0	31	1,55
Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml		10 ³		10 ³		10 ⁴		10 ⁴	
„Koloniezahl/ml“ d. Ausgangssusp. (Bezugsgröße)		556		322		3060		3000	

mit dem Kationenaustauscher STS

Vorlauf	33	0	0	1	0,03	0	0	—	—
1	20	148	7,4	8	0,4	21	1,05	—	—
2	20	130	6,5	10	0,5	29	1,45	—	—
3	20	48	2,4	5	0,25	36	1,8	—	—
4	20	21	1,05	10	0,5	23	1,15	—	—
5	20	8	0,4	10	0,5	13	0,65	—	—
6	20	3	0,15	3	0,15	13	0,65	—	—
7	20	3	0,15	7	0,35	10	0,5	—	—
Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml		10 ³		10 ³		10 ³		—	
„Koloniezahl/ml“ d. Ausgangssusp. (Bezugsgröße)		532		504		226		—	

eine zu hohe Keimkonzentration gewählt wurde. Ein Durchbruch, d. h. ein Übergang von völlig keimfreien Fraktionen zu solchen mit einem unverminderten, der Ausgangssuspension entsprechenden Keimgehalt, tritt nicht spontan zum Zeitpunkt einer maximalen Absättigung der Austauscher-oberfläche auf. Ist die Zellkonzentration der Suspension im Einzelfall zu hoch, dann kann man auch schon in den ersten Fraktionen einzelne wenige Kolonien nachweisen. Deswegen darf bei dem Ergebnis von Tab. 2 angenommen werden, daß die wenigen, bei den einzelnen Fraktionen über die Gesamtserie hinweg auftretenden Kolonien keine zufällige Kontamination sind.

In Tab. 3 und 4 sind die Versuche mit *Staph. aureus* Sg 511 und mit *Staph. albus* wiedergegeben.

Tabelle 4
Die Behandlung einer Suspension von *Staph. albus*

mit dem Anionenaustauscher MSB

N u m m e r d e r V e r s u c h e

Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	1		2		3		4	
		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.	
		pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	0	0	0	0	0	0	0	0
1	20	0	0	0	0	0	0	0	0
2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
3	20	0	0	0	0	1	0,05	0	0
4	20	0	0	0	0	18	0,9	0	0
5	20	0	0	0	0	2	0,1	0	0
6	20	0	0	0	0	1	0,05	1	0,05
7	20	2	0,1	0	0	0	0	0	0
8	20	—	—	—	—	0	0	0	0

mit dem Kationenaustauscher STS

Vorlauf	33	0	0	0	0	0	0	0	0
1	20	1	0,05	196	9,8	1	0,05	3	0,15
2	20	Rasen		27	1,4	Rasen		Rasen	
3	20	0	0	25	1,25	Rasen		Rasen	
4	20	Rasen		128	6,4	4	0,2	12	0,6
5	20	1	0,05	102	5,1	92	4,6	14	0,7
6	20	0	0	Rasen		Rasen		192	9,6
7	20	0	0	Rasen		Rasen		Rasen	
Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml		10 ³		10 ³		10 ³		10 ³	
„Koloniezahl/ml“ d. Aus- gangssusp. (Bezugsgröße)		286		282		734		322	

Aus Tab. 3 und 4 ist zu entnehmen, daß die beiden Staphylokokkenstämme bei einer mikroskopisch eingestellten Zellkonzentration von 10^3 /ml aus einem Volumen der Testsuspension bis 280 ml durch den Anionenaustauscher MSB entfernt werden. Bei einer Zellkonzentration (mikroskopische Einstellung) von 10^4 /ml (Staph. aureus) ist das Ergebnis immer noch deutlich, wenn auch aus den einzelnen Fraktionen noch wenige Kolonien zu isolieren sind. Demgegenüber ist das Ergebnis mit dem Kationenaustauscher STS bedeutend schlechter, wenn auch hier ein Teil der in der Suspension vorhandenen Keime eliminiert wird.

In Tab. 5 sind die Ergebnisse mit Sporen von *Bac. subtilis* wiedergegeben.

Tabelle 5
Die Behandlung einer Suspension von *Bac.-subtilis*-Sporen
mit dem Anionenaustauscher MSB

		Nummer der Versuche									
		1		2		3		4		5	
		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.		Zahl d. Kol.	
Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml	pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	0	0	1	0,03	0	0	0	0	0	0
1	50	1	0,02	0	0	0	0	0	0	2	0,04
2	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	50	0	0	1	0,02	5	0,1	2	0,04	0	0
4	50	0	0	0	0	1	0,02	1	0,02	1	0,02
5—8	je 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mikrosk. eingestellte Zellkonz. pro ml		10^3		10^3		10^3		10^3		10^3	
„Koloniezahl/ml“ d. Ausgangssusp. (Bezugsgröße)		212		304		650		148		140	

Bei Verwendung des Kationenaustauschers STS war in allen Fraktionen eine Rasenbildung zu beobachten, obwohl auch zu Beginn die kleinen Fraktionsvolumina von je 20 ml gewählt wurden.

Aus Tab. 5 ist zu entnehmen, daß durch den Anionenaustauscher MSB die Sporen von *Bac. subtilis* bis zu dem untersuchten Volumen von 280 ml der Testsuspension (mikroskopische Einstellung auf 10^3 Zellen/ml) eliminiert wurden, während bei dem Parallelversuch mit dem Kationenaustauscher STS selbst in den kleineren Anfangsfraktionen ein rasenartiges Wachstum auftrat.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse mit Sporen von *Bac. anthracis* wiedergegeben.

Aus Tab. 6 ist zu entnehmen, daß auch die Sporen von *Bac. anthracis* durch den Anionenaustauscher MSB aus einer wäßrigen Suspension entfernt werden, was im Parallelversuch mit dem Kationenaustauscher STS nicht der Fall war (rasenartiges Wachstum). Allerdings wurden auch mit dem Anionenaustauscher keine völlig keimfreien Fraktionen erzielt. Die

Versuche mit *Bac. subtilis* und *Bac. anthracis* sind nicht ganz vergleichbar, weil im letzteren Falle eine höhere Zellkonzentration vorlag (die mikroskopische Voreinstellung der Konzentration entfiel).

Tabelle 6

Die Behandlung einer Suspension von *Bac.-anthracis*-Sporen

mit dem Anionenaustauscher MSB

Frakt. Nr.	Frakt. Vol. in ml	N u m m e r d e r V e r s u c h e					
		1		2		3	
		Zahl d. Kol. pro Frakt.	pro ml	Zahl d. Kol. pro Frakt.	pro ml	Zahl d. Kol. pro Frakt.	pro ml
Vorlauf	33	6	0,18	5	0,15	4	0,12
1	50	203	4,06	114	2,28	118	2,36
2	50	125	2,5	132	2,64	127	2,54
3	50	120	2,4	134	3,68	126	2,52
4	50	112	2,2	121	2,42	130	2,60
5	20	80	4,0	48	2,40	52	2,60
6	20	81	4,0	38	1,9	31	1,55
7	20	78	3,9	41	2,05	39	1,95
8	20	84	4,2	46	2,3	37	1,85
„Koloniezahl“ der Ausgangssuspens. pro ml		1060		980		1020	

Bei Verwendung des Kationenaustauschers STS war in allen Fällen ein rasenartiges Wachstum zu beobachten.

Diskussion

Die Versuche mit Ionenaustauschern ergaben, daß gewaschene Keime bzw. Sporen von Bäckerhefe, *Ps. fluorescens*, *Staph. aureus* und *albus*, *Bac. subtilis* und *Bac. anthracis* durch Anionenaustauscher entfernt werden können. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu den Versuchen mit dem Kationenaustauscher, wenn auch in diesem Falle gelegentlich und verhältnismäßig wenig Zellen aus der Suspension eliminiert wurden.

Die früher beschriebenen Versuche mit Colibakterien und die oben wiedergegebenen Befunde weisen darauf hin, daß die Leistungsfähigkeit des Anionenaustauschers im Hinblick auf die Keimkonzentration einer Suspension je nach der Keimart unterschiedlich ist. Das bedeutet, daß zur Erzielung eines großen, völlig keimfreien Durchlaufvolumens der Testsuspension im einen Falle (z. B. *E. coli*) noch eine ziemlich hohe Zellkonzentration vorliegen kann, während im anderen Falle (z. B. Sporen von *Bac. anthracis*) die Zellkonzentration ziemlich klein sein muß.

Zusammenfassung

Mit einem Anionenaustauscher ist es möglich, Zellen von Bäckerhefe, Staphylokokken und Bazillensporen aus wäßrigen Suspensionen zu eliminieren. Ein Kationenaustauscher hat demgegenüber keinen oder nur einen geringen, praktisch zu vernachlässigenden Effekt. Die Leistungsfähigkeit des Anionenaustauschers variiert im Hinblick auf die Zellkonzentration der Keimsuspension mit der Keimart.

Summary

It is possible by means of an anion exchanger to eliminate cells of bread yeast, staphylococci, and spores of bacilli from their aqueous suspensions. In contrast, cation exchangers have a negligible effect, or none at all. The efficiency of anion exchangers varies both with respect to the concentration of the suspended cells as well as the species.

Résumé

A l'aide d'un échangeur d'anions il est possible d'éliminer des cellules de levure de Becker, des staphylocoques et des spores de bacilles en suspension dans l'eau. Un échangeur de cations, par contre, n'a pas d'effet ou un effet si minime qu'il est pratiquement négligeable. La puissance d'action de l'échangeur d'anions varie avec l'espèce de germe suivant la concentration cellulaire des germes en suspension.

Schrifttum

Gillissen, G., G. I. 7 (1960): 207 — Martin, G. J., I. N. Moss u. I. M. Beiler, Ion Exchange and Adsorption Agents, Little Brown and Co., Boston-Toronto, 1955 — Puck, T. T. u. B. Sagik, J. exp. Med. 97 (1953): 807 — Rotman, B., J. Bact. 72 (1956): 827 — ders., Bact. Rev. 24 (1960): 251.

Lebenslauf

Am 25. 12. 1930 wurde ich, Rosemarie, Elisabeth, Christa Dehnert, geb. Schmelzer, als zweites Kind des Generalmajors Kurt Schmelzer und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Braune in Potsdam geboren. 1937 kam ich in Erfurt in die Grundschule. 1941 starb mein Vater, mein Bruder fiel 1945. Im Februar 1950 bestand ich in Braunschweig die Reifeprüfung. Danach war ich ein Jahr Sprechstundenhilfe bei einem praktischen Arzt in Braunschweig. Im Wintersemester 1951/52 begann ich am Dolmetscher-Institut der Universität Heidelberg das Studium der spanischen und englischen Sprache. Im April 1954 bestand ich mein Examen als akademisch geprüfter Übersetzer in Spanisch und Englisch. Nach dem Studienabschluß war ich ein Jahr in Barcelona in einer Eisenhütte und ein weiteres Jahr dort in einer pharmazeutischen Fabrik tätig. Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz. Im April 1959 bestand ich hier das Physikum. Im März 1960 heiratete ich den Diplomchemiker Jürgen Dehnert. Mein Studium werde ich voraussichtlich im Frühjahr 1962 abschließen.

